

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/29, C07K 14/415, A61K 39/36		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/65060 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. November 2000 (02.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03259 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. April 2000 (12.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 18 682.0 23. April 1999 (23.04.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (71)(72) Anmelder und Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PETERSEN, Arnd [DE/DE]; Kickut 8, D-23795 Bad Segeberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SUCK, Roland [DE/DE]; Mühlenkamp 19, D-22303 Hamburg (DE). FIEBIG, Helmut [DE/DE]; Bäckerweg 10, D-21493 Schwarzenbek (DE). CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Lönshöhe 2, D-21465 Wentorf (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; D-64271 Darmstadt (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: DNA SEQUENCE AND RECOMBINANT PRODUCTION OF A GRAMINAE ALLERGEN (54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ UND REKOMBINANTE HERSTELLUNG EINES GRAMINAEN-ALLERGENS (57) Abstract <p>The invention relates to identifying and characterising a grass-pollen allergen and a recombinant DNA molecule which can be coded therefor and to corresponding DNA and peptide sequences.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft die Identifizierung und Charakterisierung eines Gräserpollen-Allergens sowie des dafür kodierenden rekombinanten DNA-Moleküls, entsprechende DNA- und Peptidsequenzen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung eines Graminaen- Allergens

5 Die Erfindung betrifft die Identifizierung und Charakterisierung eines
Gräserpollen-Allergens sowie des dafür kodierenden rekombinanten DNA-
Moleküls. Als natürlicher Rohstoff dienen die Pollen von *Phleum pratense*.
Die Erfindung schließt auch Fragmente, Teilsequenzen und Mutanten ein.
10 Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide,
Fragmente oder Varianten können zur Therapie von pollenallergischen
Krankheiten genutzt werden. Weiterhin können die rekombinant
hergestellten Proteine und Fragmente zur Diagnostik von Pollenallergien
15 genutzt werden.

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20% der
Bevölkerung von industrialisierten Länder leiden unter Beschwerden wie
20 allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien
werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von
Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen
oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40% dieser Typ 1-
Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität bei Gräserpollen
25 (Freidhoff et al., 1986, J Allergy Clin Immunol 78, 1190-201).

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um
Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach
30 Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an
der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei
IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur
Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Histamin, Prostaglandinen) und
Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden
35 klinischen Symptomen.

In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit der Allergiker, die IgE-Antikörper gegen bestimmte Allergene aufweisen, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden. Im Fall vom Lieschgras (*Phleum pratense*) sind bislang Phl p 1 (Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92, 789-796), Phl p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21, 297-307; Petersen et al., 1992), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54) und Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304) als Majorallergene und Phl p 4 (Löwenstein, 1978, Prog. Allergy 25, 1-62) sowie Gruppe 10 und 11 aus *Lolium perenne* (Ansari et. al., 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 80, 229-235) als Minorallergene charakterisiert worden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist das Allergen Phl p 4 von besonderer Bedeutung, da es eine ähnliche Molekularmasse von ca. 55 kDa (Fischer et. al., 1996, J. Allergy Clin Immunol. 98 (1), 189-98) wie das neue Allergen besitzt und damit dem erfindungsgemäß hergestellten Allergen am ehesten vergleichbar ist, sich jedoch immunologisch und biochemisch deutlich unterscheidet. Im Gegensatz zu den anderen o.g. Allergenen ist Phl p 4 das einzige, dessen genomische oder transkriptive (cDNA) Sequenz noch nicht identifiziert ist. Sequenzdaten liegen u.a. vor von Phl p 1 (Laffer et al., 1994, J. Allergy Clin. Immunol. 94, 1190-98; Petersen et al., 1995, J. Allergy Clin. Immunol. 95(5), 987-994), Phl p 5 (Vrtala et al., 1993, J. Immunol. 151 (9), 4773-4781), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108 (1), 55-59) und Phl p 2 (Dolecek et. al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304). Mit Hilfe von cDNA Sequenzen ist es möglich, rekombinante Allergene herzustellen, die in der Diagnostik und Therapie Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50, 384-391).

Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6), 336-339, Bousquet et al., 1998, J.

Allergy Clin Immunol. 102(4), 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7), 377-382).

Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf individuelle Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen enthalten. Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162, 2406-2414).

Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten Th-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5), 540-544).

Die Erfindung kann in der In-vitro- und In-vivo-Diagnostik von allergischen Erkrankungen, speziell der Pollinosis, vorteilhaft angewendet werden. Dazu wird die klonierte Nukleinsäure in einen Expressionsvektor ligiert und

dieses Konstrukt in einem geeigneten Zelltyp expremiert. Nach biochemischer Reinigung steht dieses rekombinante Allergen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung. Andererseits kann die Erfindung als eine essentielle Komponente in einem rekombinanten Allergen-haltigen oder Nukleinsäure-haltigen Präparat zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Hierbei bieten sich mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann das in der Primärstruktur unveränderte Protein Bestandteil des Präparates sein. Zum anderen kann durch gezielte Deletion von IgE-Epitopen des Gesamtmoleküls oder der Herstellung von einzelnen Fragmenten, die für T-Zell Epitope kodieren, erfindungsgemäß eine hypoallergene (allergoide) Form zur Therapie verwendet werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Schließlich wird durch die Nukleinsäure ansich, wenn sie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor ligiert wird, ein Präparat geschaffen, das direkt appliziert den allergischen Immunzustand im therapeutischen Sinne verändert.

Bei der Erfindung handelt es sich um ein rekombinantes DNA-Molekül, das aus einer Nukleinsäuresequenz (Abb. 1) besteht und für ein Allergen kodiert. Als natürlicher Rohstoff dienen Pollenkörner der Graminaen, wie z.B. *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus* u.a..

Nach der Reinigung und Isolierung des natürlichen Allergens wurde eine N-terminale Proteinsequenzierung vorgenommen. Basierend auf der daraus deduzierten Nukleinsäuresequenz erfolgt die Herstellung eines Primers. Mit Hilfe dieses Primers wurde aus einer cDNA-Population von Pollen mittels PCR die entsprechende cDNA gewonnen, kloniert und charakterisiert. Erfindungsgemäß wurden von diesem allergen kodierenden DNA-Molekül Fragmente und Teilsequenzen hergestellt.

Nach Expression des rekombinanten DNA-Moleküls bzw. der Fragmente und der Teilsequenzen mittels geeigneter Expressionsvektoren in zellulären Systemen, wurde das Allergen bzw. die hypoallergenischen Varianten bzw. Fragmente gereinigt.

Die Reinigung des natürlichen Allergens aus Lieschgraspollen wurde in einem Zweischnittverfahren durchgeführt. Nach der wässrigen Extraktion von Pollen wurde der erhaltene Extrakt mittels Hydrophober-Interaktionschromatographie in zwei Fraktionen getrennt, die Durchlaufraction und das Eluat. Die Durchlaufraction enthielt drei Allergene, Phl p 1 (30-35 kDa), Phl p 2/3 (11-14 kDa) und ein unbekanntes Allergen (55-60 kDa). Diese Proteine wurden durch Gelfiltration mit Superdex 75 voneinander getrennt.

Dieses bisher unbekannte Allergen (Arbeitsbezeichnung p55) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran gebロットet und eine genau definierte Fraktion isoliert. Von diesem p55-Molekül wurde durch Edman-Degradation eine N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt (Abb. 2).

Zur Herstellung und Klonierung der korrespondierenden cDNA des p55 wurde erfindungsgemäß ein spezifischer DNA-Primer (21mer) basierend auf der N-terminalen Sequenz konstruiert (Abb. 3). Als zweiter Primer wurde eine Ankersequenz genutzt, die in dem zur reversen Transkription genutzten Oligo-dT-Primer lokalisiert war. Mit einer cDNA, die aus der repräsentativen mRNA-Population aus Phleum-pratense-Pollen hergestellt wurde, und dem erfindungsgemäßen sowie dem Ankerprimer wurde eine PCR-Reaktion unter stringenten Bedingungen durchgeführt. In der analytischen Gelelektrophorese der PCR-Reaktion wurde ein Amplifikat mit einer Größe von 1.65 kb identifiziert. Dieses Amplifikat wurde in einen pCR2.1 Vektor ligiert und erfolgreich transformiert. Sequenzierungen der Inserts von zwei verschiedenen Klonen ergaben die identische Sequenz.

In diesem Primärampifikat wurde ein offenes Leseraster (ORF) von 1492 bp (siehe Abb. 1) identifiziert.

5 Zur Herstellung des entsprechenden rekombinanten Proteins (Abb. 4) aus dieser Nukleinsäure wurde zunächst eine Umklonierung von dem pCR2.1 Vektor mittels Restriktionsenzymen in den Expressionsvektor pProEx Htb vorgenommen. Nach der Expression und der biochemischen Reinigung des Expressionsproduktes erfolgten mehrere Analysen zur allergenen Beschaffenheit des entwickelten Proteins. In sämtlichen Analysen, z.B. 10 Western Blot und Dot Blot, reagierte das rekombinante Protein spezifisch mit IgE von Patienten, die die diagnostizierten klinischen Symptome einer Gräserpollenallergie aufweisen. Als Kontrolle wurde das natürliche p55 eingesetzt. Demnach handelt es sich bei dem rekombinanten Protein 15 eindeutig um ein Allergen. Dieses Expressionsprodukt dient damit einer hochspezifischen, verbesserten Diagnostik von Graspollen-Allergikern.

Mit der Absicht, hypoallergene Varianten für die verbesserte 20 therapeutische Anwendung herzustellen, wurden von der in dem Expressionsvektor klonierten Nukleinsäure ausgehend definierte Fragmente und Kombinationen von Teilsequenzen erfindungsgemäß entwickelt. Zudem wurden ortsgerichtete Punktmutationen, vorwiegend an den für Cystein kodierenden Triplets, eingeführt. Dieser Teil der Erfindung 25 zeichnet sich dann gegenüber der für diagnostische Zwecke entwickelten Erfindung durch reduzierte bzw. fehlende IgE-Reaktivität aus. Damit stehen Präparate für die Hyposensibilisierung zur Verfügung, die deutlich geringe bzw. fehlende Nebenwirkungen aufgrund reduzierter aufweisen. 30 Werden die für hypoallergene Proteinvariationen kodierenden Nukleinsäuren oder die unveränderte Nukleinsäure, die für p55 kodiert, mit einem humanen Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte ebenfalls als Präparate zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden.

35 Gegenstand der Erfindung ist somit

- 5 a) ein rekombinantes DNA-Molekül, welches eine Nukleotid-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das als Allergen wirkt und vorzugsweise von Graminaen (Poaceae) und monokotyledonen Pflanzen exprimiert wird, enthält;
- b) ein DNA-Molekül wie angegeben mit einer Nukleotidsequenz, die aus *Phleum pratense* stammt;
- 10 c) eine Nukleotidsequenz des angegebenen DNA-Moleküls, wie in Abb. 1 dargestellt;
- d) ein DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz besitzt, die mit der zuletzt angegebenen und wie in Abb.1 definierten Nukleotidsequenz hybridisiert;
- 15 e) Teilsequenzen und Kombinationen von Teilsequenzen, die in der Nukleotidsequenz gemäß c) oder d) enthalten ist;
- f) ein DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz a)-d) enthält, die durch gezielte Mutationen einzelner Codons und Eliminierung oder Addition verändert wird;
- 20 g) eine Nukleotidsequenz nach c), die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert;
- h) eine Nukleotidsequenz nach d), die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert;
- 25 i) eine Nukleotidsequenz nach e), die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert;
- j) eine Nukleotidsequenz nach f), die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert;
- 30 k) ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem bestehend aus dem rekombinanten DNA-Molekül definiert nach a)-d) funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz;
- l) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach c) kodiert wird;
- 35 m) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach d) kodiert wird;
- n) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach e) kodiert wird;

- o) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach f) kodiert wird;
- p) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach g) kodiert wird;
- q) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach h) kodiert wird;
- 5 r) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach i) kodiert wird;
- s) ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach j) kodiert wird;
- t) eine Methode zur Herstellung eines Polypeptides, eines Fragmentes
oder Derivates davon, durch Kultivierung von prokaryontischen oder
eukaryontischen Zellen, die mit einem Expressionsvektor gemäß Anspruch
10 11 transformiert sind, und die Gewinnung des entsprechenden Proteins
bzw. Polypeptides aus der Kultur;
- u) eine Methode zur Diagnose von Pollenallergien in vivo oder in vitro
unter Verwendung der Polypeptide gemäß l) – n);
- 15 v) eine pharmazeutische Zubereitung, die ein Polypeptid, Fragment
oder Derivat nach l) - t) enthält, zur therapeutischen Behandlung von
pollenallergischen Menschen oder Tieren;
- w) eine Methode zur Therapie von pollenallergischen Menschen oder
20 Tieren unter Verwendung der in v) definierten pharmazeutischen
Zubereitung;
- x) eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-
Vakzinierung mit den in k) definierten Konstrukten;
- 25 y) eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-
Vakzinierung mit den in k) definierten Vektoren, die immunstimulatorischen
DNA-Abschnitte enthalten.

30 Die Erfindung dient somit zur Verbesserung der In-vitro-Diagnostik im
Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des
patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Die Erfindung dient
ebenfalls zur Herstellung von deutlich verbesserten Präparaten zur
spezifischen Immuntherapie von Gräser-pollenallergien.

35

Patentansprüche

- 5 1. Ein rekombinantes DNA-Molekül, welches eine Nukleotid-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das als Allergen wirkt und vorzugsweise von Graminaen (Poacaen) und monokotelydonen Pflanzen exprimiert wird, enthält.
- 10 2. Ein DNA-Molekül nach Anspruch 1 mit einer Nukleotidsequenz, die aus *Phleum pratense* stammt.
- 15 3. Eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 2, wie in Abb. 1 dargestellt.
4. Ein DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz besitzt, die mit der in Anspruch 3 definierten Nukleotidsequenz hybridisiert.
- 20 5. Teilsequenzen und Kombinationen von Teilsequenzen, die in der Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 3 oder in dem Anspruch 4 enthalten ist.
- 25 6. Ein DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1-4 enthält, die durch gezielte Mutationen einzelner Codons und Eliminierung oder Addition verändert wird.
- 30 7. Eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 3, die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert.
8. Eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 4, die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert.
- 35

9. Eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 5, die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert.
- 5 10. Eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 6, die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert.
- 10 11. Ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem bestehend aus dem rekombinanten DNA-Molekül definiert nach den Ansprüchen 1-4 funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.
- 15 12. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 3 kodiert wird.
13. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 4 kodiert wird.
14. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 5 kodiert wird.
- 20 15. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 6 kodiert wird.
16. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 7 kodiert wird.
- 25 17. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 8 kodiert wird.
18. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 9 kodiert wird.
- 30 19. Ein Polypeptid, das von Nukleinsäure nach Anspruch 10 kodiert wird.
20. Eine Methode zur Herstellung eines Polypeptides, eines Fragmentes oder Derivates davon, durch Kultivierung von prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, die mit einem Expressionsvektor gemäß
- 35

Anspruch 11 transformiert sind, und die Gewinnung des entsprechenden Proteins bzw. Polypeptides aus der Kultur.

- 5 21. Eine Methode zur Diagnose von Pollenallergien in vivo oder in vitro unter Verwendung der Polypeptide aus den Ansprüchen 12-14.
- 10 22. Eine pharmazeutische Zubereitung, die ein Polypeptid, Fragment oder Derivat nach den Ansprüchen 12-19 enthält, zur therapeutischen Behandlung von pollenallergischen Menschen oder Tieren.
- 15 23. Eine Methode zur Therapie von pollenallergischen Menschen oder Tieren unter Verwendung der in Anspruch 22 definierten pharmazeutischen Zubereitung.
- 20 24. Eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-Vakzinierung mit den in Anspruch 11 definierten Konstrukten.
- 25 25. Eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-Vakzinierung mit den in Anspruch 11 definierten Vektoren, die immunstimulatorischen DNA-Abschnitte enthalten.

30

35

Abbildung 1: Nukleinsäuresequenz von p55

GGGAAGAAGG AGGAGAAGAA GGAGGAGAAG AAGGAGAGTG
GAGATGCTGC GTCCGGGGCC
5 GACGGAACCT ACGACATCAC CAAGCTCGGC GCCAAACCCG
ACGGCAAGAC GGA CTGCACC
AAGGAGGTGG AGGAGGCATG GGCTTCGGCT TGCGGTGGTA
CCGGGAAGAA TACGATCGTC
ATCCCCAAGG GTGATTTCTT GACCGGGCCT CTGAATTTCA
CCGGGGCCATG CAAGGGCGAC
AGCGTCACCA TCAAGCTGGA CGGCAACCTG CTGAGCTCCA
10 ACGACCTGGC CAAGTACAAG
GCTAACTGGA TCGAGATCAT GCGGATCAAG AAAC TCACTA
TCACCGGCAA AGGCACGCTC
GACGGCCAAG GCAAGGCCGT GTGGGGCAAG AACAGCTGCG
CCAAGAACTA CAACTGCAAG
ATCTTGCCAA ACACATTGGT GCTGGACTTC TGTGACGACG
CTCTCATCGA AGGCATCACC
15 CTCCTAAACG CCAAGTTCTT CCATATGAAC ATCTACGAGT
GCAAGGGCGT GACCGTCAAG
GACGTGACCA TCACCGCGCC CGGGGACAGC CCCAACACCG
ACGGCATCCA CATCGGCGAC
TCGTCCAAGG TCACCATCAC CGACACCACC ATCGGCACCG
GCGACGACTG CATCTCCATC
GGCCCCGGAA GCACCGGCCT CAACATCACC GCGGTGACCT
20 GCGGTCCAGG CCACGGCATC
AGCGTTGGCA GCCTGGGACG GTACAAGGAC GAGAAGGACG
TGACCGACAT CACCGTAAAG
AACTGCGTGC TCAAGAAGTC CACCAACGGC CTCCGGATCA
AGTCGTACGA GGACGCCAAG
TCGCCGCTGA CGGCGTCGAA GCTGACCTAC GAGAACGTGA
AGATGGAGGA CGTGGGCTAC
25 CCCATCATCA TCGACCAGAA GTACTGCCCC AACAAAGATCT
GCACCTCCAA GGGAGACTCC
GCCAGGGTCA CCGTCAAGGA CGTCACCTTC CGCAACATCA
CCGGCACCTC CTCCACCCCC
GAGGCCGTCA GCCTGCTCTG CTCCGACAAG CAGCCCTGCA
ATGGTGTCAC CATGAACGAC
GTCAAGATCG AGTACAGCGG CACCAACAAC AAGACCATGG
30 CTGTCTGCAC CAACGCCAAG
GTCACCGCCA AGGGTGTCAG CGAGGCTAAC ACCTGCGCCG
CCTGATG
//

Abbildung 2: N-terminale Aminosäuresequenz p55

GKKEEKKDEK KESGDAASXA

5

Abbildung 3: p55 spezifischer Primer

GGI AAI AAI GAI GAI AAI AAI GAI GA

10

Abbildung 4: Deduzierte Aminosäuresequenz

SEQUENCE 395 AA; 41619 MW; 829349 CN;

15

GKKEEKKEEK KESGDAASGA DGTYDITKLG AKPDGKTDCT KEVEEAWASA
CGGTGKNTIV
IPKGDFLTGP LNFTGPCKGD SVTIKLDGNL LSSNDLAKYK ANWIEIMRIK
KLITITGKGTL
DGQ GKAVWGK NSCAKNYNCK ILPNTLVLDL CDDALIEGIT LLNAKFFHMN
IYECKGVTVK
DVTITAPGDS PNTDGIHIGD SSKVTITDTT IGTGDDCISI GPGSTGLNIT
GGACGPGHGI
SVGSLGTRYK EKDVTIDITVK NCVLKKSTNG LRIKSYEDAK SPLTASKLTY
ENVKMEDVGY
PIIIDQKYCP NKICTSKGDS ARVTVKDVTF RNITGTSSTP EAVSLLCSDK
QPCNGVTMND
VKIEYSGTNN KTMVCTNAK VTAKGVSEAN TCAA*

20

25

30

35